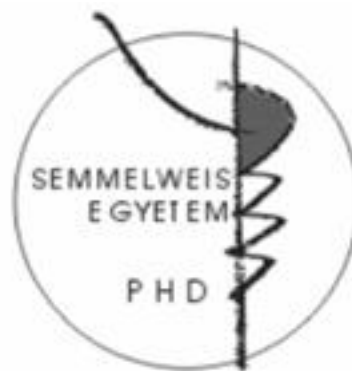


Egér különböző szöveteiből, szerveiből izolált mesenchymalis őssejtek összehasonlító vizsgálata

Doktori tézisek

Sági Bernadett

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Habil Uher Ferenc kutatóprofesszor, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kovalszky Ilona egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Lippai Mónika, egyetemi adjunktus Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Demeter Judit egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Minkó Krisztina egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Molnár Kinga egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2013

Bevezetés

Az őssejtbiológia az elmúlt években a modern kori orvosi kutatások egyik legforrongóbb területévé nőtte ki magát. Az őssejtek ugyanis olyan különleges sajátságokkal rendelkeznek, amelyek révén regenerációra, és elpusztult sejtek pótlására is alkalmasak lehetnek. Eleinte a kutatások a korai embrionális korból származó embrionális őssejtekben rejlő lehetőségekre koncentráltak. Az etikai és technikai nehézségek miatt azonban a későbbiekben egyre inkább a szöveti őssejtek kerültek a regeneratív orvoslással foglalkozó kutatók figyelmének középpontjába. Ide tartoznak többek között a multipotens tulajdonságú vérképző őssejtek (HSC-k) és a mi vizsgálódásaink tárgyát is képező mesenchymalis ő- vagy stroma sejtek (MSC-k).

Az MSC-k olyan, nem vérképző ő- és elődsejtek, amelyeket először a csontvelőben írtak le, mint fibroblast-szerű morfológiájú kolóniaképző sejteket. A sejtek pontosabb beazonosítása érdekében az ISCT (International Society for Cellular Therapy) nevű nemzetközi szervezet 2006-ban kidolgozott egy kritériumrendszert az emberi MSC-kre vonatkozóan. Ennek értelmében azokat a sejteket nevezhetjük mesenchymalis ő-, vagy helyesebben stroma sejteknek, amelyek egyidejűleg megfelelnek az alábbi kritériumoknak:

1. Adherensek, azaz a tenyésztőedény falához kitapadva növekednek;
2. CD105, CD73 és CD90 pozitívok, de nem hordoznak vérképző ő- és elődsejtekre, illetve a különböző vérsejtfejlődési sorokra jellemző markereket, vagyis CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 molekulákat és HLA-DR negatívok;
3. *in vitro* csont-, porc- és zsírsejtekké egyaránt képesek differenciálódni.

Az évek során kiderült, hogy a csontvelői stroma sejtekhez morfológiailag és funkcionálisan nagyon hasonló sejtek egér és ember számos más szövetéből és szervéből is sikeresen kinyerhetők. A kutatások próbálnak magyarázatot találni arra a tényre, hogy az MSC-k miért találhatók meg szinte az összes szövetünkben.

Az MSC-knek számos olyan előnyös tulajdonsága van, amelyek különösen alkalmassá tehetik őket számos betegség gyógyítására. Szövetregenerációban betöltött szerepük egyértelmű, mivel differenciációs potenciáljuk révén képesek közvetlen

pótolni az elhalt sejteket. Ezen kívül a sejtek az általuk termelt molekulákon keresztül segítik elő az adott szövet helyreállítását (trofikus és immunmoduláló hatás). Olyan szolúbilis anyagok ezek, amelyek megakadályozzák az immunrendszer túlműködését, csökkentik a gyulladást, a hegeképződést, gátolják az apoptózist, és elősegítik az angiogenezist, valamint az endogén szöveti őssejtek osztódását.

A MSC-kkel kapcsolatos intenzív kutatások ellenére azonban mostanáig is csak igen keveset tudunk arról, hogy az MSC-k ontogenikusan honnan is erednek és mi a valódi biológiai funkciójuk *in situ*. Enélkül viszont a humán gyógyászatban való felhasználásuk is kockázatokat rejt magában. A sejtek szervezetben betöltött valószínűleg nélkülözhetetlen szerepének terápiás célú kiaknázásához elengedhetetlen volna megismerni az MSC-k kialakulását és fejlődését az ontogenezis során.

A szakirodalomban nagyon kevés adat van a sejtek eredetére vonatkozóan, és ezek sem egységesek. Alapvetően háromféle elképzelés létezik. Néhány kutatócsoport szerint a stroma kultúrákban található őssejtek valójában a korai embrionális időszakból változatlanul fennmaradt, a kötőszövetekben megbújó pluripotens sejtek. Mások azt állítják, hogy a különböző szervekben előforduló mesenchymalis őssejtek egy olyan egységes rendszert alkotnak, melynek valamennyi sejtje a primer mesenchymából alakult ki a gastrulációt követően az első EMT (epitelialis-mesenchymalis átalakulás) alkalmával. A harmadik tábor úgy gondolja, hogy a különböző MSC populációk a mesoderma szegmentációja után, az egyes testszelvényekben (talán a somitákban) egymástól függetlenül alakulnak ki, de hasonló funkció(ka)t látnak el az egyes szervekben (vagyis párhuzamosan fejlődnek).

A sejtek valódi leszármazását a klasszikus sejtvonala követéses (lineage tracing) módszerrel nem lehetséges visszakövetni, mivel eddig nem sikerült találni egyetlen olyan marker molekulát sem, amely kizárólag csak az MSC-kre lenne jellemző. A sejtek ontogenikus eredetére csak indirekt módon, a bennük kifejeződő molekulák révén tudnánk esetlegesen következtetni. Ebből a célból tüztük ki magunk elé egér számos szövetéből illetve szervéből kinyert mesenchymalis stroma sejt populációk összehasonlító génexpressziós és fehérje szintű vizsgálatát.

Célkitűzések

A mesenchymalis őse-, vagy stroma sejtek (MSC-k) jelentős szerepet játszanak a szövetek megújulásában, és különböző mechanizmusokon keresztül szabályozzák – általában gátolják – az immunrendszer működését is.

Jellemzőiket és működésüket azonban eddig főleg a csontvelőből származó stroma sejteken vizsgálták. Kérdés, hogy a más forrásból – zsírszövet, lép, thymus és aorta fal – származó MSC-k mennyiben különböznek csontvelői társaiktól, és mi lehet az esetleges különbségek jelentősége a majdani sejterápiás beavatkozások során?

(i) Elsőként felnőtt (2-3 hónapos) és fiatal (14 napos) C57Bl/6 egerek különböző szerveiből 6 adherens stroma sejtvonalat állítottunk elő, és arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ezek a sejtek felszíni markereik és in vitro differenciálódási képességük alapján valóban MSC-knek tekinthetők-e? Ha igen, akkor teljesen azonos-e a sejtfelszíni antigén mintázatuk, illetve differenciálódási képességük, vagy vannak-e kisebb különbségek a különböző szervekből származó MSC-k között?

(ii) A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy vannak-e eltérések a különböző MSC vonalak génkifejeződési mintázatában, különös tekintettel a sejtek esetleges pozicionális memóriájára utaló Hox, valamint további, az ontogenezis során kulcsszerepet játszó – ugyancsak homeotikus szelektor domént tartalmazó – transzkripciós faktorokat kódoló génekre? Ennek alapján rendelkeznek-e a különböző eredetű MSC-k pozicionális memóriával, azaz a sejtenyészetben is „emlékeznek-e” arra, milyen volt az anatómiai lokalizációjuk in vivo?

(iii) Lehet-e eredményeinkből az MSC-k eredetére és fejlődésére vonatkozó következtetéseket is levonni? Kifejeznek-e a különböző szervekből izolált MSC-k az adott szervre jellemző, illetve annak fejlődése során nélkülözhetetlen transzkripciós faktorokat is?

Módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez fiatal (14 napos) és felnőtt (10-12 hetes) C57Bl/6 egereket (Országos Onkológiai Intézet, Budapest) használtunk a Fővárosi Állategyészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás által megadott etikai engedély birtokában.

MSC-k izolálása és tenyésztése

Az MSC-k izolálását Peister és munkatársai által kidolgozott módszerrel, néhány apróbb, már korábban leírt módosítással, illetve a különböző szöveti forrásokra alkalmazva végeztük. Az állatokat nyaki diszlokációval áldoztuk fel, majd combcsontjaikat, lépüket, thymusukat, aortájukat és hasi zsírszövetüket eltávolítottuk. A csontvelői sejteket a combcsontok komplett tenyésztőfolyadékkal (CM) történő kifűjésével nyertük ki. A CM összetétele a következő: DMEM/F12 médium (Dulbecco által módosított Eagle/Ham-féle F12 tartalmú médium) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% foetális borjú szérum (FCS), 5% ló szérum (Invitrogen), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamin (Invitrogen), kiegészítve heparinnal 5 U/ml végső koncentrációban.

A thymusból, lépéből és aortából a sejteket mechanikai aprítással és a szövetek passzírozásával nyertük ki. PBS-ben történő mosás után a törmelékeket úgy távolítottuk el, hogy egy 60 µm lyukátmérőjű hálón szűrtük át a sejtes szuszpenziót. A sejteket ezután kétszer Hanks' oldatban mostuk, majd 25 cm² tenyésztőedénybe szélesztettük 2-4x10⁶ sejt/cm² sűrűségben és 5% CO² tartalmú nedves közegben tenyésztettük inkubátorban 72 óráig. A nem adherens sejteket a médium heti kétszeri cseréjével távolítottuk el.

A hasi és lágyéki zsírszövetet PBS-sel alaposan megmostuk. Ez két-három alkalommal, egy 600-as fordulatszám mellett végzett, 8 percen át tartó centrifugálással történt. Ezt követően 0.1% kollagenáz (Sigma-Aldrich) tartalmú PBS-ben, plate rázató automatára helyezve, 250 percenkénti rotáció mellett, 37°C-on emésztettük a szövetet 30 percen át. Az érett zsírsejteket és a kötőszöveti részeket az emésztés végétével 1200 rpm mellett 10 percig történő centrifugálás után elöntöttük, a visszamaradt pellet az ún.

stromalis vasculáris frakció (SVF), mely - többek között - a mesenchymalis stroma sejteket is tartalmazza. Újraszuszpendálva az SVF-et még egy mosást végeztünk PBS-ben. Az újabb szuszpendálást követően a továbbiakban ugyanúgy jártunk el a szélesztés és a tenyésztés során, mint a többi stroma sejt kultúra esetében.

A konfluens primer kultúrákat PBS-sel mostuk, majd tripszin-EDTA oldattal választottuk el a sejteket az edény aljától (5 perc, 37 °C inkubálás után). PBS-sel történő mosást követően a 1:5 arányban hígítottuk a sejteket, majd szélesztettük őket egy 75 cm²-es tenyésztőedényben (BD Falcon). Az ezt követő áttoltások hasonló módon történtek. Mivel a kultúrák a 6., 7. áttolásig morfológiailag heterogének, vagyis a stroma sejteken kívül vérképző- és egyéb pl. endothel progenitorokat is tartalmaznak, ezért csak a 10 és 25. passzálás közötti állapotban használtuk fel őket a kísérleteinkben.

PCR alapú vizsgálatok

PCR módszerrel egyrészt géncsoportok átíródásának egyidejű vizsgálatát végeztük el PCR Array rendszer segítségével. Ennek során 84-84 gén kifejeződését mértük meg kétféle RT² Profiler PCR Array-vel, a Mouse Mesenchymal Stem Cell PCR Array és a Mouse Homeobox Genes PCR Array (SA Biosciences) segítségével. Három különböző állatcsoportból, egymástól függetlenül alapított sejtvonalakat vizsgáltunk meg, így valódi biológiai párhuzamosokon dolgoztunk. Az RT² qPCR-Grade RNA Isolation Kit (SA Biosciences, Frederick, USA) segítségével, a gyártó utasításait követve a sejtek teljes RNS tartalmát izoláltuk. Ezt követően minden mintából 1,5 µg-nyi teljes RNS kivonatot RT² First Strand Kit (SA Biosciences) segítségével cDNS-be írtunk át. Az így nyert cDNS szolgált aztán kiindulásul az RT² SYBR Green qPCR Master Mixet (SA Biosciences) használó, valós idejű (real-time) PCR méréseinkhez. A cDNS-ek amplifikációját Roche Light Cycler 480 készülékkel végeztük, úgy, hogy a 10 perces, 95°C-on végzett polimeráz aktiválást 40 olyan ciklus követte, melyekben 15 másodpercig tartó, 95°C-os denaturálás és 1 perces 60°C-os amplifikáció váltotta egymást.

A PCR Array mérések során kapott küszöbciklus értékek egy részét kvantitatív valós idejű PCR módszerével, egyedi primerek segítségével is megmértük. Minden mintából egységesen 0,5 µg RNS-t írtunk cDNS-be a High Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA) felhasználásával és a hozzá mellékelt utasítások szerint. A qRT-PCR méréseket az Eppendorf Mastercycler ep realplex4 berendezésen végeztük, úgy, hogy a 10 perces, 95°C-on végzett enzimaktiválást 40 olyan ciklus követte, melyekben 20 másodpercig tartó, 95°C-os denaturálás és 65 másodpercig tartó 60°C-os amplifikáció váltotta egymást.

A statisztikai elemzést az SPSS 13.0 programmal végeztük és a Kruskal-Wallis tesztet használtuk. Az eredményt akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a P értéke kisebb volt, mint 0,05.

A PCR eredmények validálása a fehérjekifejeződés szintjén

A sejtfelszíni molekulák (CD31, CD34, CD44, CD73, CD90.2, CD45R/B220) fehérje szintű ellenőrzését áramlási citometriával végeztük.

Transzkripciós faktorok (Mkx, Pitx1, Tbx5, En2, Tlx1) jelenlétének kimutatására immunfluoreszcens jelölést alkalmaztunk.

A Tbx5 fehérje kimutatása Western blot technikával történt.

Továbbá, a hat különböző szöveti eredetű, konfluens MSC kultúra felülszójában ELISA módszerrel a következő citokinek jelenlétét vizsgáltuk meg a Mouse Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISArray Kit (SABiosciences) segítségével: Il-1a, Il-1b, Il-2, Il-4, Il-6, Il-10, Il-12, Il-17A, Ifn- γ , Tnf- α , G-Csf és GM-Csf.

A mesenchymalis őssejtek plaszticitásának vizsgálata

Csont irányú differenciáltatás

Az ún. osteogén médium pontos összetétele a következő: DMEM, 10% FCS, 10mM β -glicerofoszfát, 50 μ g/ml aszkorbinsav, 10^{-8} M hidrokortizon, 2mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin és 50 μ g/ml sztreptomycin. A differenciáltatás során a médiumot 3-4 naponta cseréltük a tenyészeteken. Két hét elteltével az extracellulárisan lerakódott kalcium kristályokat Alizarin vörös festékkel (Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá.

Zsírsejt irányú differenciáltatás

Az ún. adipogén médiumnak a pontos receptje: DMEM/F12, 10% FCS, 10^{-7} M dexamethazone, 0,5 mM IBMX, 100 IU penicillin és 50 µg/ml streptomycin. A médiumot a differenciáltatás során 3-4 naponta cseréltük a tenyészetben. Ezt követően a sejteket 10%-os formalinban fixáltuk és olajvörös (Oil Red O, Sigma-Aldrich) festékkel festettük.

Az aorta fal MSC-k vérképzés-támogató képességének vizsgálata

Dexter kultúra

GFP+ aorta eredetű sejteket 5-10-szeres többségben lévő, frissen kinyert csontvelői sejtek jelenlétében, Dexter és Testa által előzőleg leírt körülmények között - ún. Dexter kultúrában - tenyésztettük. Két hét elteltével a tenyészetek sejtjeiben a GFP és egyes leukocita marker gének (CD45R, CD11b, Gr1) együttes kifejeződését FACS méréssel vizsgáltuk.

Osteoclast irányba történő differenciáltatás

Az aortafal eredetű MSC-k tápfolyadékát hat napon át 10^{-8} M $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ vitaminnal (Supelco, Bellefonte, PA) kezeltük, elérve így a JAO-MSK-k osteoclast irányú differenciálódását. A tartarát rezisztens savas foszfátáz enzim tartalmú (TRAP pozitív) osteoclastokat az Acid Phosphatase Leukocyte Kit (No. 386) (Sigma-Aldrich) segítségével mutattuk ki.

A vérképző rendszer in vivo betelepülésének vizsgálata

Az aorta eredetű sejtek in vivo repopulációs képességét transzplantációs kísérlettel vizsgáltuk meg. Recipiensként felnőtt C57Bl/6 egereket használtunk. A myeloablatív besugárzás egy dózisban, ^{137}Cs -forrásból származó, 80 cGy/perc intenzitású γ -sugárzással történt az Országos Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Intézetben. A besugárzást követően az állatokat 2×10^6 aorta eredetű sejtrel transzplantáltuk. Pozitív kontrollként 10^6 frissen preparált csontvelői sejtet, negatív kontrollként 50 µl sejtmentes PBS-t adtunk intravénásan.

Eredmények

Sejtfelszíni markerek vizsgálata

A különböző szövetekből kinyert stroma sejt populációkon először megvizsgáltuk az MSC-k azonosítására szolgáló felszíni molekula mintázatot. Az áramlási citometriás mérések szerint MSC tenyészeink pozitívak Sca-1-re és CD44-re, kivéve az aortából származó sejteket (JAo-MSc-t), ami Sca-1-ből, és a thymus eredetű sejteket (JThy-MSc-t), ami CD44-ből jóval kevesebbet fejez ki. A CD73 a fiatal állatok csontvelőjéből izolált MSC-ken (JCsv-MSc) és a JAo-MSc-ken, míg a CD105 a JCsv-, JLP- (fiatal egér lép eredetű sejtjeiben) és JAo-MSc-ken található meg a legnagyobb mennyiségben. A CD90.2 jelenléte pedig a felnőtt állatok zsírszöveti MSC-iben (Zs-MSc) volt igen szembetűnő, míg a többi szervből származó MSC-ben alig fejeződik ki. A fehérjekifejeződés mellett a gének szintjén is információt akartunk kapni az MSC „markerek” jelenlétéről vagy hiányáról az egyes MSC populációkban. Azt tapasztaltuk, hogy a PCR Array-vel kapott eredmények igen jól tükrözték az áramlási citometriás mérések adatait.

Továbbá egyik általunk vizsgált MSC populáció sem fejez ki olyan hematopoetikus markereket, mint a CD34, CD3e, CD45R/B220, CD11b, Ly-6G és a TER-119 fehérjék, illetve az endothel sejtfejlődési sorra jellemző CD31 molekulát.

A sejtek plaszticitásának vizsgálata

Zsír irányú differenciálódást elősegítő tenyésztőközegben tartva az MSC-ket, azok bizonyos idő elteltével intracellulárisan lipidcseppeket halmoznak fel, míg a csont irányú differenciálódás során a sejtek extracelluláris, kalciumban gazdag mineralizált mátrixot hoznak létre. Ezzel egyértelműen bizonyítható, hogy MSC tenészeink multipotens tulajdonságú sejtekből állnak. A különböző szövetekből származó MSC-k esetén azonban némi eltéréseket tapasztaltunk ezen differenciálódási képességben. Ennek okát a gének szintjén is megvizsgálandó, PCR módszer segítségével megmértük az osteogén, valamint az adipogén differenciálódásban szerepet játszó Runx2, Pparg és osteokalcin (Bglap1) gének mRNS szintjét. Azt találtuk, hogy az első két gén valamennyi MSC típusban hasonló mértékben fejeződik ki, viszont az osteokalcin

(Bglap1) transzkriptumai a JCsv-MSC-kben jóval meghaladták a többi MSC-ben mért mennyiséget.

Az MSC-k nem fejeznek ki pluripotencia géneket

Néhány, nemrégiben megjelent tanulmány szerint a kifejlődött szervezet testi sejtjeinek egy része, így pl. az MSC-k is kifejezhetnek olyan géneket, amelyeket eredetileg a pluripotens állapottal hozták összefüggésbe (*Oct4*, *Nanog*, *Rex1*). A Mouse Mesenchymal Stem Cell PCR Array segítségével megvizsgáltuk ezen faktorok jelenlétét a különböző szervi eredetű MSC kultúrákban. Méréseink egyik MSC sejt vonal esetében sem mutatták ki a fenti pluripotencia markerek átíródását. Eredményeink további igazolásaként egyedi primerek segítségével ugyanezen génekre lefuttatunk néhány kvantitatív RT-PCR reakciót is úgy, hogy pozitív kontrollként az egér R1/E embrionális őssejt vonalat használtunk. Ennek eredménye megerősítette a korábbi méréseinkét, vagyis hogy egyik általunk vizsgált MSC tenyészet sem tartalmaz pluripotens géneket kifejező sejteket.

Az aorta fali sejtek további vizsgálata

Az MSC PCR Array eredményei szerint a JAo-MSC-kben igen magas - a másik 5 MSC populációhoz képest 9- és 15-szörös - telomeráz reverz transzkriptáz (*Tert*) és leukémia inhibíciós faktor (*Lif*) mRNS szint mérhető. A JAo-MSC-k abban is kitűnnek a többi kultúra közül, hogy jóval kisebb méretűek és jellegzetes, a többi MSC-től eltérő növekedési morfológiájuk van. Ez a fenotípus emlékeztet egy éretlenebb sejt típusra, az ún. „mesoangioblastra”, amely fiatal egér aortájából is könnyen izolálható. A megfigyelések szerint a mesoangioblastok a mesoderma fejlődésének egy jóval korábbi fázisát jelentik, mint a mesenchymalis őssejtek. Ennek következtében képesek még vérképző sejtek létrehozására is, ez a tulajdonság azonban a mesenchymalis őssejtekre már nem jellemző. Az aorta-eredetű stroma sejtek valódi kilétét tisztázandó egy sor olyan kísérletet végeztünk el, amelyekben az aorta sejteket vérképző sejtekké próbáltuk differenciáltatni *in vitro* (Dexter kultúra, osteoclast irányú differenciáltatás tesztekben) és *in vivo* (transzplantációs kísérletben). Eredményeink szerint azonban semmi nem utal arra, hogy az aortából izolált sejtek között vérképző sejtek is lennének.

A mesodermális eredetre utaló gének kifejeződése az MSC-kben

A különböző MSC sejtvonalak mesodermális eredetének vizsgálatát a leggyakoribb kötőszöveti fehérjék mRNS szintjének meghatározásával kezdtük el. Az I. típusú kollagén α -lánc (*Colla1*), vimentin (*Vim*) és α -simaizom aktin (*Acta2*) jelenlétét PCR Array-vel, valamint kvantitatív RT-PCR-rel határoztuk meg. A viszonyítási sejttypusként használt JCsv-MSK-k jelentős mértékben átírják a *Colla1*-t, a *Vim*-t és az *Acta2*-t is. Ami a többi MSC vonalat illeti, a JCsv-MSK-khez hasonlóan magas *Colla1*, *Vim* és *Acta2* kifejeződést mutattak, utóbbiból viszont az aorta sejtek kevesebbet fejeznek ki.

Kvantitatív RT-PCR-rel megvizsgáltunk továbbá három olyan transzkripciós faktort kódoló gén (*Gata4*, *Gata6* és *Nkx2.5*) kifejeződését, melyek a mesodermális eredetű sejtek fejlődésében és differenciálódásában játszanak szerepet. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a különböző MSC populációkat mesodermális eredetű mesenchymalis sejteknek tekinthetjük.

Az MSC-k pozicionális memóriája

A homeotikus szelektor (Hox) gének egy - evolúciós értelemben - konzervált transzkripciós faktor családot kódolnak. Kifejeződésük, illetve a különböző Hox gének kifejeződésének kombinációja meghatározza, hogy adott pozícióban milyen struktúrák fejlődjenek. A kifejlett állatban is megőrzött expressziós mintázatuk pedig, mint egyfajta pozicionális memória jelzik, hogy az adott sejt melyik anatómiai helyről származik.

Annak eldöntésére, hogy a Hox gének vajon szerepet játszanak-e az eltérő eredetű stroma sejtek közötti szövetspecifikus különbségek kialakításában, mindegyik MSC mintában megvizsgáltuk a Hox génkifejeződési mintázatot. Ezen kísérletek során elsősorban a Mouse Homeobox (HOX) Genes PCR Array használatára támaszkodtunk, amely összesen 84 Hox-specifikus primer párral dolgozik.

A 4 klasszikus Hox gén család (Hox a, b, c, d) számos génje közül 24-nek a jelenlétét hasonlítottuk össze a különböző stroma sejt kultúrákban. A PCR vizsgálat azt az eredményt hozta, hogy a 24-ből 5 gén (*Hoxa1,7*, *Hoxb3,4* és *Hoxd9*) az összes MSC

sejtvonalban igen nagy mennyiségben íródott át. További 6 gén (*Hoxb1,9, Hoxd1,3,12,13*) egyik sejtpopulációban sem volt megtalálható, a maradék 13 gén (*Hoxa9, Hoxb2,7,8, Hoxc6,8,9,10,11,12,13* és *Hoxd4,8*) pedig eltérő kifejeződési mintázatot mutatott a különböző forrásból származó tenyészetekben. Elmondhatjuk tehát, hogy az MSC-k egyedi “Hox kóddal” jellemezhetők, mely speciális génmintázat utal az adott sejtpopuláció eredeti anatómiai elhelyezkedésére.

Találtunk továbbá olyan, homeodomén-tartalmú transzkripciós faktorokat kódoló géneket – mint amilyen a cut-like homeobox 1 (*Cux1*), a distal-less homeobox 1 (*Dlx1*), a Mohawk (*Mkx*), és a sine oculis-related homeobox 4 (*Six4*) – amelyek egyaránt magas kifejeződést mutattak valamennyi sejtvonalunkban. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy pl. az *Mkx* gén minden, somita eredetű sejtvonalban kifejeződik, hasonlóan a *Six4* génhez, mely a somiták és a végtagbimbók területén is expresszálódik.

Még érdekesebb, hogy sikerült olyan transzkripciós faktorokat azonosítanunk, amelyek csak egy adott MSC populációban fejeződtek ki jelentős mértékben, míg a többiben teljesen hiányoztak. A T-box 5 (*Tbx5*) például, amely a felső végtagok és a szív fejlődésében játszik szerepet, különösen nagy mennyiségben íródott át a JThy- MSC-kben. Az engrailed homeobox 2 (*En2*) a JAo- MSC-kben volt szembetűnő, a T-sejt leukémia homeobox 1 (*Tlx1*) pedig a JLP- MSC-ben. Ez utóbbi transzkripciós faktor alapvető szereppel bír a lép korai szervtelepének mintázatkialakításában és a lépsejtek proliferációjában. A paired-like homeodomén transzkripciós faktor 1 (*Pitx1*) - mely a hátsó végtagok fejlődésében működik közre - kifejeződése a combcsontból nyert csontvelő eredetű sejtekben (JCsv- MSC-k és Csv- MSC-k) volt jellemző. Fehérjeszintű mérésekkel sikerült megerősítenünk ezeket az eredményeket, vagyis, hogy az adott anatómiai eredethez megfelelő géntermék kifejeződés társul az egyes sejtpopulációkban.

Következtetések

Az előzőekben ismertetett eredményeink tükrében azt a következtetést fogalmaztuk meg, hogy

(i) 14 napos és 10-12 hetes egér csontvelőjéből, zsírszövetéből, lépéből, thymusából és aorta falából kinyerhető adherens stroma sejtek legfőbb jellegzetességeik alapján MSC-knek tekinthetők.

A csontvelőhöz hasonlóan a többi szöveti eredetű stroma sejt is adherens, kisebb-nagyobb mennyiségben, de kifejeznek CD44, CD73 és CD90 sejtfelszíni antigéneket, és nem expresszálnak vérképző és endothel sejtekre jellemző molekulákat. Ugyanakkor mind a 6 sejtvonal képes differenciálódni adipocytá és osteoblast irányokba, noha némileg eltérő mértékben. Ennek okát abban látjuk, hogy az adott szöveti környezet kisebb-nagyobb mértékben, de befolyásolja az adott sejtpopuláció jellemzőit és funkcióját.

(ii) Az általunk vizsgált MSC-k a mesodermából alakultak ki, ugyanis valamennyi MSC populációnk igen nagy mennyiségben fejez ki mesenchymalis és mesodermális sejtekre jellemző molekulákat. Továbbá mindegyikük egyedi HOX gén mintázattal jellemezhető, amely egyfajta pozicionális információt hordoz a sejtek eredeti anatómiai elhelyezkedésére vonatkozóan.

A somiták fejlődésével összefüggésbe hozható *Mkx* és *Dlx1* gének vizsgálata alapján kiderült, igen nagy mennyiségben fejeződnek ki valamennyi általunk vizsgált MSC kultúrában. Ez alapján azt feltételezzük, hogy az MSC-k ontogenetikus eredete a mesodermán belül is a somitákhoz köthető.

(iii) Az eltérő szövetekből származó MSC-k testtájanként eltérőek.

Az egyes MSC populációk olyan transzkripciós faktorokat kódoló géneket is kifejeznek, amelyek csak egy-egy szövetből kinyert sejtekben voltak mérhetőek, míg a többiben nem. Ilyen módon a *Pitx1* a csontvelő, a *Tbx5* a thymus, *Tlx1* a lép, az *En2* az aorta fali stroma sejtekben volt egyedül megtalálható.

Mindezen megfigyeléseket azzal magyarázzuk, hogy a sejtek kialakulása egységes lehet, mely a postszegmetációs mesoderma, pontosabban a somiták kialakulásának helyére és idejére tehető. Majd később, ahogyan a somiták feldarabolódásával az egyes testszelvények megjelennek, úgy az MSC-k is szétvándorolnak, és az eltérő testtájak területén kialakuló szövetekben telepednek meg. Ott aztán amellet, hogy megőrzi eredeti genetikai emlékezetüket, az új környezethez alkalmazkodva újabb jellegeket is felvesznek. A sejtek a magukban hordozott, leszármazásukra utaló emlékezetüket még *in vitro* sejt kultúrában tartva sem veszítik el, ahogyan azt kísérleteinkben is sikerült bebizonyítanunk.

Eredményeink nagy jelentőséggel bírnak a humán terápiás felhasználás, ezen belül is a regenerációs orvoslás számára, hiszen ezidáig azt gondoltuk, hogy a test szinte bármely régiójából származó MSC-k képesek egymást pótolni. Ennek oka, hogy eddig szinte semmit sem tudtunk az MSC-k filogeneziséről, de még arról sem, hogy a sejtek természetben mennyire őrzik meg (epi)genetikai memóriájukat. Munkánk nagymértékben hozzájárulhat új és meglévő, MSC-vel kapcsolatos genetikai kutatások és klinikai kísérleti kipróbálások előre mozdításához.

Publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

Folyóirat cikkek:

1. Beáta Hegyi, Bernadett **Sági**, János Kovács, Judit Kiss, Veronika S. Urbán, Gabriella Mészáros, Éva Monostori, and Ferenc Uher: *Identical, Similar or Different? Learning about Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Various Mouse Tissues: Bone Marrow, Spleen, Thymus, and Aorta Wall*. International Immunology 22:551-559. (2010) (IF=3.301)
2. Urbán S. Veronika, Hegyi Beáta, **Sági** Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: *A diabetes mellitus őssejtterápiája – az endokrin pancreas regenerációja*. Diabetologia Hungarica 19:279-286. (2011)
3. Bernadett **Sági**, Pouneh Maraghechi, Veronika S. Urbán, Beáta Hegyi, Anna Szigeti, Roberta Fajka-Boja, Gyöngyi Kudlik, Katalin Német, Éva Monostori, Elen Gócza, Ferenc Uher: *Positional Identity of Murine Mesenchymal Stem Cells Resident in Different Organs is Determined in the Post-Segmentation Mesoderm*. Stem Cells and Development 21:814-828. (2012) (IF=4.791)
4. Hegyi Beáta, **Sági** Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: *A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladásos- és immunfolyamatok szabályozásában*. Immunológiai Szemle IV:4-10. (2012)

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

1. Urbán S. Veronika, Benevolenskaya Elisabeta, Kiss Judit, **Sági** Bernadett, Hegyi Beáta, Uher Ferenc: *A genetikán is túl - Az epigenetika előretörése és orvosi vonatkozásai*. Orvosi Hetilap 153:214-221. (2012)

2. Tátrai Péter, **Sági** Bernadett, Szigeti Anna, Szepesi Áron, Szabó Ildikó, Bősze Szilvia, Kristóf Zoltán, Markó Károly, Szakács Gergely, Urbán István, Mező Gábor, Uher Ferenc, Német Katalin: A novel cyclic RGD-containing peptide polymer improves serum-free adhesion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to bone implant surfaces. *Journal of Materials Science- Materials in Medicine* 24:479-488. (2013) (IF=2.141)